

细胞重编程技术和诱导性多能干细胞治疗视网膜疾病研究现状

方绿洁 综述 丁勇 梁海 黄靖邦 审校

3002 墨尔本, 澳大利亚眼科研究中心 墨尔本大学(方绿洁、梁海、黄靖邦); 510632 广州, 暨南大学附属第一医院眼科 暨南大学(方绿洁、丁勇)

通信作者: 黄靖邦, Email: wongcb@unimelb.edu.au

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.009

【摘要】 随着细胞重编程技术的发展, 如今我们可以通过转录因子来重编程转录组, 从而使一种细胞类型转化为另一种细胞类型。值得注意的是, 这种方法实现了将体细胞转化为诱导性多能干细胞(iPSCs), 为获得患者特异性多功能干细胞提供了可能。Shinya Yamanaka 及其研究小组于 2006 年首次发现了这项技术, 最开始的 iPSCs 是由小鼠成纤维细胞在转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 的作用下诱导去分化而形成。这项技术在医疗领域具有巨大的潜力, 为研究和开发治疗眼部疾病方法开创了新纪元。本文将对患者特异性 iPSCs 在建造三维疾病模型以及各型视网膜疾病模型, 细胞替代治疗及临床试验, 药物高通量筛选试验及毒性检验方面的运用进行综述, 并论述直接重编程技术的进展, 以及利用 iPSCs 和细胞重编程技术进行眼科研究的未来方向。

【关键词】 诱导性多功能干细胞; 细胞重编程; 视网膜; 疾病建模; 细胞治疗; 药物筛选

基金项目: 澳大利亚国家卫生医学研究理事会项目 (1084256); 凯尔和罗西日基金会项目

Research progress cellular reprogramming technology and induced pluripotent stem cells for retinal diseases treatment

Lyuji Fang, Yong Ding, Helena Liang, Raymond Ching-Bong Wong

Centre for Eye Research Australia, Ophthalmology, Department of Surgery, University of Melbourne, Melbourne 3002, Australia (Fang L, Liang H, Wong RC); The First Affiliated Hospital of Jinan University, Jinan University, Guangzhou, 510632, China (Fang L, Ding Y)

Corresponding author: Raymond Ching-Bong Wong, Email: wongcb@unimelb.edu.au

【Abstract】 Current advances in cellular reprogramming technology has demonstrated that the identity of a cell can be converted by the use of master transcription factors to reprogram the transcriptome. Notably, this allows us to convert somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs), providing a feasible method to generate patient-specific pluripotent stem cells. This technology was firstly discovered by Shinya Yamanaka's group in 2006. The initial iPSCs were formed by the induction of dedifferentiation in mouse fibroblasts using transcription factors: Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc. This approach has tremendous medical potentials to revolutionize the way we study and develop treatment for ocular diseases. Here we reviewed the potential of using patient-specific iPSCs for 3D disease modeling and various types of retinal disease modeling, cell replacement therapy and clinical trials, high-throughput screening test and drug toxicity testing. We also discussed the recent development of direct reprogramming and the future direction for utilising iPSCs and cellular reprogramming technology for eye research.

【Key words】 Induced pluripotent stem cells; Cellular reprogramming; Retina; Disease modeling; Cell therapy; Drug screening

Acknowledgment: Lyujie Fang was supported by scholarship from the Jinan University, Raymond Wong was supported by Kel & Rosie Day Foundation, grants from the National Health and Medical Research Council (1084256) and the University of Melbourne (Louisa Jean De Bretteville Bequest). The Centre for Eye Research Australia receives operational infrastructure support from the Victorian Government.

Fund program: National Health and Medical Research council (1084256); Kel & Rosie Day Foundation

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是 成体细胞通过重编程后获得的具有类似胚胎干细胞特性和功

能的细胞。这项细胞重编程技术在 2006 年由科学家 Shinya Yamanaka 及其研究小组首次发现,是由小鼠成纤维细胞在转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 的作用下诱导去分化而形成。以往大量研究表明,iPSCs 具有 2 种重要的特性:(1)它能分化成为所有胚胎生殖细胞(包括外胚层、中胚层、内胚层);(2)它能在保持正常核型的情况下无限增生,这为体外实验提供了无限细胞来源^[1]。近年来有研究表明,重编程因子过表达能使人的体细胞转化为 iPSCs^[2],这一发现为获得患者特异性自体干细胞提供了可行的方法。由 iPSCs 产生的特异性分化细胞,还可以潜在地修复受损或患病的组织,从而治疗广泛的疾病及损伤。最近,一份对阿斯利康公司(AstraZeneca)小分子药物项目的纵向回顾研究发现,成功研制出一种药物需要 5 个关键因素:(1)树立正确目标;(2)确立适用人群;(3)确定靶器官;(4)安全性;(5)商业化潜力^[3]。应用 iPSCs 技术有助于解决前 4 项障碍。视网膜是由大脑向外延伸的视觉神经末梢组织,其结构复杂、精细、脆弱且代谢旺盛。视网膜疾病种类较多且复杂,主要表现为不同程度的视力障碍,严重者可致盲。本文对患者特异性 iPSCs 在疾病建模、细胞治疗和药物筛选 3 个方面的应用进行综述,探讨 iPSCs 对治疗视网膜疾病的研究进展(图 1)。

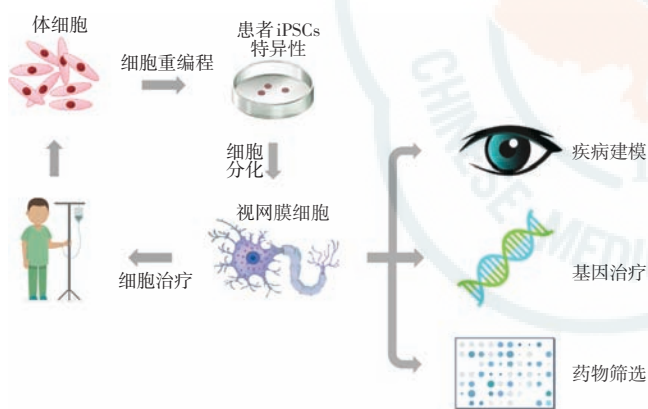


图 1 iPSCs 在研究和治疗视网膜疾病的作用示意图 部分图片摘自 Freepik 网站 iPSCs:诱导性多能干细胞

1 iPSCs 在疾病建模中的应用

许多致盲疾病都包含了一种或多种眼部退行性病变,其机制错综复杂。目前,探索 iPSCs 建立疾病模型的效能已成为研究热点。在疾病建模中,患者来源的 iPSCs 可结合三维培养进行类器官分化。研究显示,可将干细胞分化成含有与器官结构相似的多个细胞层的三维组织结构,因此能进一步分析其中包含的细胞类型以及不同细胞类型之间的相互作用。目前已发现许多类器官分化的方法,包括视网膜类器官^[4]、大脑类器官^[5]、前脑类器官^[6]、肝脏类器官^[7]和肾脏类器官^[8],其中 Lancaster 等^[5]已证明大脑类器官可以模拟小头畸形,CDK5RAP2 依赖性小头畸形患者 iPSCs 衍生的大脑类器官较小,而且伴有早期神经元分化缺陷。除了三维培养,研究者们亦尝试建造不同视网膜细胞类型的疾病模型,包括视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)、视网膜色素上皮细胞

(retinal pigment epithelium, RPE)细胞和感光细胞^[9-11]。

青光眼是一类以病理性眼压升高、特征性视神经损害 and 视野缺损为特征的致盲眼病,其视神经病变的主要病理基础是 RGCs 凋亡。Ohlemacher 等^[12]研制出一种基于 iPSCs 的原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)模型,此 iPSCs 起源于患者的体细胞,并具有 OPTN 基因突变,而 OPTN 基因是近年来已被确认的 POAG 致病基因^[13]。有趣的是,这类具有 OPTN 基因突变的由 iPSCs 诱导出的 RGCs 与临床上因 POAG 导致的 RGCs 损失一致,它们均表现出活化的 caspase-3 且细胞凋亡水平升高。此外,用神经保护因子脑源性神经营养因子和色素上皮衍生因子治疗诱导出的 RGCs 的研究结果显示,活化的 caspase-3 水平显著降低^[14]。另外,最近的研究指出 iPSCs 能成功模拟 Leber 遗传性视神经病的疾病特性^[15],特别是 RGCs 的细胞凋亡。这些研究表明,由患者特异性 iPSCs 衍生的 RGCs 制作视神经病变模型具有可行性。年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是一种主要表现为 RPE 退化的多基因疾病,且与一系列风险等位基因/位点相关。AMD 发病的其他危险因素还包括年龄和持续的氧化应激等。Chang 等^[16]用于性 AMD 患者的体细胞诱导 iPSCs,并使它们分化成为 RPE,与对照组相比,这些 AMD 患者的 RPE 活性氧(reactive oxygen species, ROS)表达水平更高,这与目前的观点一致,即氧化应激在 AMD 导致 RPE 损害中起着重要的作用^[17]。Yang 等^[18]发现,患者特异性的 iPSCs 分化出的 RPE 在 ARMS2/HTRA1 基因位点具有高风险单倍型或保护单倍型。A2E 是一种随着年龄增长而积累的脂褐质荧光基团, Sparrow 等^[19]用 A2E 体外诱导 RPE 老化,结果表明高风险 AMD-RPE 组呈现出 ROS 水平升高,通过 FOXO3A 和 β -catenin 信号传导的超氧化物歧化酶 2 应激反应受损。这些发现揭示了导致 RPE 细胞死亡的氧化应激机制和 AMD 的发病机制。

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是遗传性视网膜营养不良的一种异质性形式,以感光细胞功能障碍及退化而造成渐进性视功能缺失为特征。从病理学方面来看,有 50 个以上的基因突变即可导致 RP^[20]。例如,在 RP 中存在约 15% 的视紫红质突变^[21]。视紫红质编码 G 蛋白偶联受体,可检测视杆细胞中的光信号。突变的视紫红质可使细胞内蛋白质错误折叠、错误定位,导致钙稳态失调和严重的视杆细胞应激反应^[22]。Jin 等^[23]用具有视紫红质突变的患者特异性 iPSCs 分化出感光细胞,发现这些细胞的存活率不高,且伴随内质网应激与凋亡的标志物表达增加^[24]。这些研究为 RP 中感光细胞损失的发病机制提供了有价值的参考。

2 iPSCs 在细胞治疗中的应用

利用 iPSCs 进行细胞替代治疗是一个新兴且具有广泛应用前景的视神经病变治疗方法,尤其在疾病后期,出现明显细胞受损时。在某些情况下,干细胞释放的营养因子可能有助于移植后的再生。以往有研究证明了用人类 iPSCs 衍生的祖细胞治疗患视神经病变动物模型的可行性。由 iPSCs 衍生的视网膜神经细胞通过移植可整合并存活于小鼠模型的视网膜中^[25]。

Satarian 等^[26]发现 iPSCs 衍生的祖细胞移植至视网膜可改善视神经损伤大鼠模型视功能,其视觉诱发电位在移植后明显恢复。用细胞疗法治疗视神经病变并不局限于替代受损的 RGCs。Abu-Hassan 等^[27]研究发现,通过移植 iPSCs 衍生的小梁网细胞可恢复体外 POAG 患者眼前段灌注器官培养模型的眼压。

近几年,iPSCs 在临床试验方面也取得了很大进展。2014 年,Takahashi 团队完成了世界首例人类自体 iPSCs 衍生细胞移植治疗,采用患者 iPSCs 产生的 RPE 自体移植来治疗 AMD,移植后 1 年,该患者视力无下降,且未发现因细胞治疗带来的其他异常,这为治疗的安全性提供了支持。但在 2015 年准备进行第 2 例自体细胞移植时,在患者 iPSCs 中发现了基因突变,该项临床试验因此暂停^[28]。2017 年 3 月,Yamanaka 团队实施了世界首例人类异体 iPSCs 衍生细胞移植治疗 AMD,他们把捐献者的皮肤细胞重编程为 iPSCs 后转化为视网膜细胞并移植到患者眼中,至今共有 5 例患者接受了该手术,目前正处于观察期^[29]。这项进展为今后的防盲治盲工作开辟了新的道路。

3 iPSCs 在药物筛选中的应用

利用患者特异性 iPSCs 衍生的细胞开展研究,为理解疾病的发展和开发相关药物提供了基础。首先,不同于原代细胞,iPSCs 能为药物试验提供无限的患者特异性细胞;其次,iPSCs 疾病模型能成为一个研究患者生理相关情况的独特平台,可用于临床前药物试验;再次,患者特异性 iPSCs 具有发展精准医疗的巨大潜力,它让药物试验能基于患者特定的基因构成以及特定的疾病类型^[30]。这代表了药物研发与医疗模式的范式转变,使个性化治疗成为可能。在此领域中,令人振奋的研究之一就是利用患者特异性 iPSCs 进行药物高通量筛选试验及毒性检验。然而,截至目前,并无使用 iPSCs 衍生视神经细胞进行药物试验的相关报道。但在现有的利用 iPSCs 神经疾病模型的实验中还是能看到其蕴含的巨大潜能。例如,Burkhardt 等^[31]利用肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)患者 iPSCs 衍生的运动神经元测试了 1 757 种药物对调节 TDP-43 聚集体的作用,TDP-43 聚集体被认为与 ALS 有密切联系^[32]。一些 FDA 认证的药物具有调节 TDP-43 的能力,对研发 ALS 的新疗法具有巨大意义。Lee 等^[33]用 iPSCs 衍生的神经前体筛查了 6 912 个复合物,测试其在提高 *IKBKAP* 基因表达方面的能力,并确定了 8 个候选药物,其中一些已进入临床试验阶段。Thorne 等^[34]利用 iPSCs 衍生的星形胶质细胞从 4 100 个复合物中筛选出了 9 个,它们能减少由过氧化氢诱导的氧化应激对细胞造成的损害,这种损害正与许多神经退行性疾病相关。另外,Pei 等^[35]利用 iPSCs 及其衍生的细胞,如神经干细胞、神经元和星形胶质细胞,进行 80 种药物毒性测试,其中一些被认为具有潜在的神经毒性。从这些研究中可发现,把 iPSCs 用于药物筛选与毒性测试是一种经济、有效的选择,且能更好地预测药物的疗效与安全性,加速新药研发过程。

4 当前面临的挑战

虽然 iPSCs 技术具有巨大潜力,它仍然面临许多限制和挑

战。其中一个潜在的限制因素为遗传变异,不同患者或同一患者不同克隆细胞之间的遗传变异可能会掩盖疾病本身的影响。实验中不同患者之间的差异可能是由不同的遗传背景造成的^[36]。研究发现,与来自不同个体的 iPSCs 相比,来自同一个体的 iPSCs 的克隆变异性更低。变异的原因包括培养条件、表观遗传记忆和一些克隆体的遗传不稳定性^[37]。增加患者和对照组的数量可以降低疾病建模的变异性。分别从不同患者和健康人群中收集大量与疾病相关的 iPSCs 和对照,而不是简单地一对一地比较,可克服单个 iPSC 细胞系变异的影响。即使疾病表型被遗传背景的变化所掩盖,iPSCs 仍然具有疾病建模、定制个性化治疗的潜力。另一种解决患者群体遗传背景变化的方法是通过基因编辑技术纠正患者基因的突变产生 iPSCs 等基因对照组,或通过正常 iPSCs 或胚胎干细胞中引入特定疾病的基因突变产生疾病等基因系。由于这些受编辑的细胞都来源于同一个原始细胞,通过这种方法将减轻因患者遗传背景差异而产生的变异。近几年,随着可编程核酸酶的出现,基因编辑技术进展迅速,特别是随着 CRISPR/Cas 技术的改进,使基因编辑技术更简单、更容易应用于 iPSCs^[38]。随着基因编辑技术的改进,我们将看到更多利用基因修饰后的 iPSCs 来进行疾病建模,以及通过此技术来验证潜在的致病突变,进行全基因组关联研究,包括更复杂的多基因疾病研究。

迟发性疾病 iPSCs 模型的建立也是一项挑战。首先,分化的细胞在许多功能上显示出不成熟的特性。一些研究发现,原始细胞具有的老化特征很难在 iPSCs 重编程衍生的细胞中体现^[39]。已有许多实验尝试用不同方法体外诱导细胞成熟、老化来建立更好的迟发性疾病模型。研究显示,iPSCs 衍生细胞的扩展培养能产生更多具有成熟表型的细胞,正如模拟体内细胞发展过程。因此,疾病相关的分化可能需要数月才能获得成熟细胞^[40]。可喜的是,通过小分子识别和外因子表达能加速细胞成熟过程,这已在神经元分化实验中被证实^[41]。此外,利用共培养系统能更好的模拟体内环境,可引导 iPSCs 分化为更加成熟的细胞类型^[42]。运用体外 iPSCs 模型来模拟老化带来的影响也是一个难点,常见的方法是在体外应用压力因子以引起与老化有关的 DNA 或其他分子损伤,包括氧化应激(如过氧化氢)以及其他毒素(如刀豆素 A)均曾应用于 iPSCs 帕金森病模型中^[43]。类似地,在老化过程中特定细胞产生的分子也有用途,如在 AMD 模型中可用 A2E 治疗老化的 RPE^[44]。虽然存在着许多局限性,但与此同时相应的策略也在不断被发现,相信在不久的将来,利用 iPSCs 将能建立更好的体外疾病模型。

近几年,iPSCs 在细胞治疗进展迅速,但仍然需要充分考虑其安全性。在自体细胞移植方面,患者来源的 iPSCs 仍然携带有致病基因,需通过基因修正技术校正后才可移植回患者体内。另外,关于自体 iPSCs 及其衍生细胞是否具有内在免疫原性的问题仍然存在争议。一些实验支持自体 iPSCs 及其衍生细胞的移植可引起免疫排斥反应^[45-46],另一些则支持移植细胞仅引起极小的排斥反应或不引起免疫排斥^[47-48],可能与使用的 iPSC 细胞的细胞系、移植的细胞数目以及移植位点的差异有关。目前还需要更全面的研究来解决这个问题。而在异体细胞移

植方面,首先要考虑的则是免疫排斥反应。Yamanaka 团队构想建立一个 iPSCs 的细胞银行,储存与患者人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 相匹配的捐赠者 iPSCs 以提高异体细胞移植的成功率。目前, Yamanaka 团队应用于再生医学研究的细胞系仅来源于 1 个捐献者,未来他们将从 5~10 个捐献者中获得更多 HLA 特异性细胞系,而这些细胞系将会与日本 30%~50% 的人口相匹配,能为更多患者服务。iPSCs 细胞银行中的细胞可以直接使用,与自体 iPSCs 衍生细胞移植相比,大大缩短了准备时间,且费用更低^[29]。

iPSCs 最初是通过整合病毒载体(如逆转录病毒载体或慢病毒载体)引入重编程因子而产生,但是由转基因整合到宿主细胞基因组增加了插入突变的可能性,且重编程因子 *c-Myc* 为致癌基因,研究者们担忧其临床应用的安全性^[49]。2008 年, Yamanaka 等^[50]和 Wernig 等^[51]分别发现了删除 *c-Myc* 也能进行重编程的新方法,但效率较低。后来, Okita 等^[52]发现 *N-Myc* 和 *L-Myc* 也具有与 *c-Myc* 相同的诱导作用,从而取代了 *c-Myc*。为了使 iPSCs 更适用于临床,研究者们创造了多种非整合方法来避免因逆转录病毒和慢病毒转导的重编程因子介导相关的插入突变和遗传改变的风险,其中应用较广的非整合方法有附加体 DNA (episomal vector)、mRNA 和仙台病毒,相对简单且高效^[53]。非整合方法可避免基因组嵌入带来的基因突变,从而降低 iPSCs 临床应用的风险。

另外,使用 iPSCs 模型进行药物筛选也存在一些挑战,如分化细胞需要具有高品质,还要有可观的数量及均质性以满足大量数据筛选的需求。在过去的近十年中,人体大部分细胞类型的分化方案陆续发表。然而,这些方案在不同实验室条件下产生的效率、细胞质量和复制能力都有所不同,而且用于生产 iPSCs 细胞系的不同也会影响分化结果。研究表明, iPSCs 不同的细胞系可能会有不同的分化倾向^[54]。建立在可扩展的人群中产生目的细胞类型的标准化分化方案将有助于使这些区别最小化。用这些分化方案产生均质细胞群又是一项难点。许多方案产生目的细胞类型的效率低,导致出现异质细胞群。应用细胞特异性标志物可将细胞纯化或富集,应用荧光磁激活细胞分选可分离出目的细胞类型。此外,还可应用免疫标记的细胞特异性标志物在异质细胞群中图像跟踪,以发现药物在目的细胞中的精确效应。研究者们正在努力通过利用 iPSCs 的报告基因转染细胞系筛选小分子来改善分化方案,通过产生更高质量和更高产量的均质成熟细胞群来增强分化效率^[55]。

5 展望

除了利用 iPSCs,细胞重编程也是最近的研究热点,为疾病建模提供了另一条路径。通过重组因子的异位表达,可以实现细胞从一种类型到另一种类型的直接重新编程,而无需经过 iPSCs 阶段。这种直接重编程的方法已取得了许多可喜的成果,包括把成纤维细胞转化为神经祖细胞、神经元、多巴胺神经元、心肌细胞和肝细胞^[56-60]。除此之外,还有实验利用其他细胞进行直接重编程,如使肝细胞重编程为功能性胰岛 β 样细胞^[61]。细胞直接重编程这一方法已被证明具有高效率,成纤

维细胞转化为神经元的效率大于 50%,且不需要再通过 iPSCs 衍生分化,可节省大量时间^[62]。另外,与 iPSCs 重编程不同,直接重编程出的神经元可保留原先成纤维细胞的老化特征,利用这一特性可以更好地建立衰老模型,尤其是迟发性的年龄相关性疾病^[63]。最近,有研究使用直接重编程技术来建模 ALS,发现用 ALS 患者的成纤维细胞直接重编程为运动神经元后出现疾病特异性变异,这些细胞不能与骨骼肌形成神经肌肉连接,正与临床症状一致^[64]。并且该研究通过筛选药物后进一步发现,一种名为 kenpaullone 的小分子物质对该变异具有治疗效果,这也说明了直接重编程对药物研发有重要潜力^[64]。

虽然重编程技术的发展日新月异,但仍然存在许多挑战。与目前许多 iPSCs 分化方案类似,它们均需要在同质性以及效率方面进行改进。值得注意的是,我们需要进行广泛的表型和功能测试来确定重编程细胞是否符合目的细胞类型。在药物筛选之前高度富集的均质细胞群可通过一系列纯化步骤得到。目前,有越来越多实验针对开发不同细胞类型的直接重编程进行研究,其中一个限制因素为这类细胞需要具有增生性,否则无法建立疾病组织模型,但可以通过将患者体细胞直接重编程为目的细胞类型的祖细胞形式,再以细胞增生产生足够数量,使细胞成熟后用于疾病建模。直接重编程技术的内在机制仍有待进一步研究阐明。

6 小结

综上所述, iPSCs 具有体外疾病建模、细胞治疗、药物筛选的潜力,但这一技术仍存在许多问题。目前,许多研究者正在努力探索提高 iPSCs 疾病模型的效能、进行细胞治疗试验、制作药物筛选平台。在未来的几年里,我们相信能看到 iPSCs 更广阔的发展空间,期待 iPSCs 能为人类疾病的治疗做出巨大贡献。志谢 本文作者方绿洁受暨南大学资助,通信作者黄靖邦受凯尔和罗西日基金会(Kel & Rosie Day Foundation)、澳大利亚国家卫生医学研究理事会(National Health and Medical Research Council, 1084256)以及墨尔本大学资助研究经费。澳大利亚眼科研究中心受到维多利亚州政府的运营基础设施支持

参考文献

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282 (5391): 1145-1147.
- [2] Hung SS, Pébay A, Wong RC. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells using hair-derived keratinocytes [J/OL]. *J Vis Exp*, 2015, (102): e53174 [2017-09-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692540/>. DOI: 10.3791/53174.
- [3] Cook D, Brown D, Alexander R, et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13 (6): 419-431. DOI: 10.1038/nrd4309.
- [4] Völkner M, Zschätzsch M, Rostovskaya M, et al. Retinal organoids from pluripotent stem cells efficiently recapitulate retinogenesis [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6 (4): 525-538. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.03.001.
- [5] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. *Nature*, 2013, 501 (7467): 373-379. DOI: 10.1038/nature12517.
- [6] Qian X, Nguyen HN, Song MM, et al. Brain-region-specific organoids

- using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure [J]. *Cell*, 2016, 165(5) : 1238–1254. DOI:10.1016/j.cell.2016.04.032.
- [7] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant [J]. *Nature*, 2013, 499(7459) : 481–484. DOI:10.1038/nature12271.
- [8] Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPSC cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis [J]. *Nature*, 2015, 526(7574) : 564–568. DOI:10.1038/nature15695.
- [9] Gill KP, Hung SS, Sharov A, et al. Enriched retinal ganglion cells derived from human embryonic stem cells [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 30552 [2017-09-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4978994/>. DOI:10.1038/srep30552.
- [10] Lidgerwood GE, Lim SY, Crombie DE, et al. Defined medium conditions for the induction and expansion of human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium [J]. *Stem Cell Rev*, 2016, 12(2) : 179–188. DOI:10.1007/s12015-015-9636-2.
- [11] Gonzalez-Cordero A, Kruczek K, Naeem A, et al. Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(3) : 820–837. DOI:10.1016/j.stemcr.2017.07.022.
- [12] Ohlemacher SK, Sridhar A, Xiao Y, et al. Stepwise differentiation of retinal ganglion cells from human pluripotent stem cells enables analysis of glaucomatous neurodegeneration [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(6) : 1553–1562. DOI:10.1002/stem.2356.
- [13] Aung T, Rezaie T, Okada K, et al. Clinical features and course of patients with glaucoma with the E50K mutation in the optineurin gene [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(8) : 2816–2822. DOI:10.1167/iovs.04-1133.
- [14] Ohlemacher SK, Sridhar A, Xiao Y, et al. Stepwise differentiation of retinal ganglion cells from human pluripotent stem cells enables analysis of glaucomatous neurodegeneration [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(6) : 1553–1562. DOI:10.1002/stem.2356.
- [15] Hung SS, van Bergen NJ, Jackson S, et al. Study of mitochondrial respiratory defects on reprogramming to human induced pluripotent stem cells [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(5) : 945–957. DOI:10.18632/aging.100950.
- [16] Chang YC, Chang WC, Hung KH, et al. The generation of induced pluripotent stem cells for macular degeneration as a drug screening platform: identification of curcumin as a protective agent for retinal pigment epithelial cells against oxidative stress [J/OL]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6 : 191 [2017-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4117985/>. DOI:10.3389/fnagi.2014.00191.
- [17] Yildirim Z, Ucgun NI, Yildirim F. The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011, 66(5) : 743–746.
- [18] Yang J, Li Y, Chan L, et al. Validation of genome-wide association study (GWAS)-identified disease risk alleles with patient-specific stem cell lines [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(13) : 3445–3455. DOI:10.1093/hmg/ddu053.
- [19] Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J, et al. A2E, a byproduct of the visual cycle [J]. *Vision Res*, 2003, 43(28) : 2983–2990.
- [20] Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa [J]. *Clin Genet*, 2013, 84(2) : 132–141. DOI:10.1111/cge.12203.
- [21] Briscoe AD, Gaur C, Kumar S. The spectrum of human rhodopsin disease mutations through the lens of interspecific variation [J]. *Gene*, 2004, 332 : 107–118. DOI:10.1016/j.gene.2004.02.037.
- [22] Xiong B, Bellen HJ. Rhodopsin homeostasis and retinal degeneration: lessons from the fly [J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(11) : 652–660. DOI:10.1016/j.tins.2013.08.003.
- [23] Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, et al. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(2) : e17084 [2017-09-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037398/>. DOI:10.1371/journal.pone.0017084.
- [24] Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, et al. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa [J/OL]. *Mol Brain*, 2014, 7 : 45 [2017-09-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4058693/>. DOI:10.1186/1756-6606-7-45.
- [25] Hambricht D, Park KY, Brooks M, et al. Long-term survival and differentiation of retinal neurons derived from human embryonic stem cell lines in un-immunosuppressed mouse retina [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 920–936.
- [26] Satarian L, Javan M, Kiani S, et al. Engrafted human induced pluripotent stem cell-derived anterior specified neural progenitors protect the rat crushed optic nerve [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8) : e71855 [2017-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747054/>. DOI:10.1371/journal.pone.0071855.
- [27] Abu-Hassan DW, Li X, Ryan EI, et al. Induced pluripotent stem cells restore function in a human cell loss model of open-angle glaucoma [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(3) : 751–761. DOI:10.1002/stem.1885.
- [28] Souied E, Pulido J, Staurengi G. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration [J/OL]. *N Engl J Med*, 2017, 377(8) : 792 [2017-09-28]. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc1706274>. DOI:10.1056/NEJMc1706274.
- [29] Cyranoski D. Japanese man is first to receive “reprogrammed” stem cells from another person [J/OL]. *Nature*, 2017 [2018-01-06]. <https://www.nature.com/news/japanese-man-is-first-to-receive-reprogrammed-stem-cells-from-another-person-1.21730>. DOI:10.1038/nature.2017.21730.
- [30] SSC H, Khan S, Lo CY, et al. Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 177 : 32–43. DOI:10.1016/j.pharmthera.2017.02.026.
- [31] Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, et al. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2013, 56 : 355–364. DOI:10.1016/j.mcn.2013.07.007.
- [32] Neumann M, Kwong LK, Lee EB, et al. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(2) : 137–149. DOI:10.1007/s00401-008-0477-9.
- [33] Lee G, Ramirez CN, Kim H, et al. Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(12) : 1244–1248. DOI:10.1038/nbt.2435.
- [34] Thorne N, Malik N, Shah S, et al. High-throughput phenotypic screening of human astrocytes to identify compounds that protect against oxidative stress [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(5) : 613–627. DOI:10.5966/sctm.2015-0170.
- [35] Pei Y, Peng J, Behl M, et al. Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes [J]. *Brain Res*, 2016, 1638(Pt A) : 57–73. DOI:10.1016/j.brainres.2015.07.048.
- [36] Rouhani F, Kumasaka N, de Brito MC, et al. Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells [J/OL]. *PLoS Genet*, 2014, 10(6) : e1004432 [2017-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4046971/>. DOI:10.1371/journal.pgen.1004432.
- [37] Mills JA, Wang K, Paluru P, et al. Clonal genetic and hematopoietic heterogeneity among human-induced pluripotent stem cell lines [J]. *Blood*, 2013, 122(12) : 2047–2051. DOI:10.1182/blood-2013-02-484444.
- [38] Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(5) : 573–586. DOI:10.1016/j.stem.2016.04.013.
- [39] Lapasset L, Milharet O, Prieur A, et al. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(21) : 2248–2253. DOI:10.1101/gad.173922.111.

- [40] Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs [J/OL]. Nat Commun, 2014, 5 : 4047 [2017-09-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370190/>. DOI:10.1038/ncomms5047.
- [41] Chambers SM, Qi Y, Mica Y, et al. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30 (7) : 715-720. DOI:10.1038/nbt.2249.
- [42] Tang X, Zhou L, Wagner AM, et al. Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cell Res, 2013, 11 (2) : 743-757. DOI:10.1016/j.scr.2013.05.002.
- [43] Cooper O, Seo H, Andrabi S, et al. Pharmacological rescue of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson's disease [J/OL]. Sci Transl Med, 2012, 4 (141) : 141ra90 [2017-09-20]. <http://stm.sciencemag.org/content/4/141/141ra90.long>. DOI:10.1126/scitranslmed.3003985.
- [44] Yang J, Li Y, Chan L, et al. Validation of genome-wide association study (GWAS)-identified disease risk alleles with patient-specific stem cell lines [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23 (13) : 3445-3455. DOI:10.1093/hmg/ddu053.
- [45] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells [J]. Nature, 2011, 474 (7350) : 212-215. DOI:10.1038/nature10135.
- [46] Todorova D, Kim J, Hamzeinejad S, et al. Brief report: immune microenvironment determines the immunogenicity of induced pluripotent stem cell derivatives [J]. Stem Cells, 2016, 34 (2) : 510-515. DOI:10.1002/stem.2227.
- [47] Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells [J]. Nature, 2013, 494 (7435) : 100-104. DOI:10.1038/nature11807.
- [48] Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, et al. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2013, 12 (4) : 407-412. DOI:10.1016/j.stem.2013.01.006.
- [49] Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10 (6) : 678-684. DOI:10.1016/j.stem.2012.05.005.
- [50] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26 (1) : 101-106. DOI:10.1038/nbt1374.
- [51] Wernig M, Meissner A, Cassady JP, et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2 (1) : 10-12. DOI:10.1016/j.stem.2007.12.001.
- [52] Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366 (1575) : 2198-2207. DOI:10.1098/rstb.2011.0016.
- [53] Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17 (3) : 183-193. DOI:10.1038/nrm.2016.8.
- [54] Bock C, Kiskinis E, Versteppen G, et al. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines [J]. Cell, 2011, 144 (3) : 439-452. DOI:10.1016/j.cell.2010.12.032.
- [55] Holmqvist S, Brouwer M, Djelloul M, et al. Generation of human pluripotent stem cell reporter lines for the isolation of and reporting on astrocytes generated from ventral midbrain and ventral spinal cord neural progenitors [J]. Stem Cell Res, 2015, 15 (1) : 203-220. DOI:10.1016/j.scr.2015.05.014.
- [56] Meyer S, Wörsdörfer P, Günther K, et al. Derivation of adult human fibroblasts and their direct conversion into expandable neural progenitor cells [J/OL]. J Vis Exp, 2015, (101) : e52831 [2017-07-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4545090/>. DOI:10.3791/52831.
- [57] Zhou C, Gu H, Fan R, et al. MicroRNA 302/367 cluster effectively facilitates direct reprogramming from human fibroblasts into functional neurons [J]. Stem Cells Dev, 2015, 24 (23) : 2746-2755. DOI:10.1089/scd.2015.0123.
- [58] Yoo J, Noh M, Kim H, et al. Nanogrooved substrate promotes direct lineage reprogramming of fibroblasts to functional induced dopaminergic neurons [J]. Biomaterials, 2015, 45 : 36-45. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.12.049.
- [59] Ghazizadeh Z, Rassouli H, Fonoudi H, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to a cardiac fate using reprogramming proteins [J]. Cytotherapy, 2014, 16 (4) : S39-S39. DOI:10.1016/j.jcyt.2014.01.134.
- [60] Huang P, Zhang L, Gao Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14 (3) : 370-384. DOI:10.1016/j.stem.2014.01.003.
- [61] Chang FP, Cho CH, Shen CR, et al. PDGF facilitates direct lineage reprogramming of hepatocytes to functional β -like cells induced by Pdx1 and Ngn3 [J]. Cell Transplant, 2016, 25 (10) : 1893-1909. DOI:10.3727/096368916X691439.
- [62] Yoo AS, Sun AX, Li L, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons [J]. Nature, 2011, 476 (7359) : 228-231. DOI:10.1038/nature10323.
- [63] Mertens J, ACM P, Ku M, et al. Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects [J]. Cell Stem Cell, 2015, 17 (6) : 705-718. DOI:10.1016/j.stem.2015.09.001.
- [64] Liu ML, Zang T, Zhang CL. Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients [J]. Cell Rep, 2016, 14 (1) : 115-128. DOI:10.1016/j.celrep.2015.12.018.

(收稿日期:2018-03-13 修回日期:2018-09-05)

(本文编辑:刘艳)

· 病例报告 ·

误诊为 Coats 病的视网膜海绵状血管瘤一例

傅征 杨晖 龚颂建

361000 厦门市儿童医院

通信作者:杨晖, Email: xmyh9808@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.010

患儿,男,12岁,于外院拟诊为左眼 Coats 病,2016年10月29日转诊厦门市儿童医院,拟行眼底激光光凝治疗。家长诉患

儿视力自幼较好,生活自如,学校体检时发现左眼视力较差,在当地县医院检查发现,左眼眼底鼻下象限周边视网膜可见多个